

テクニカルノート

ダブルノックアウトES細胞による遺伝子の機能解析

湯尻俊昭¹⁾ 岡 芳知山口大学医学部生体シグナル解析医学講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)
(内科学第三講座)日本学術振興会 特別研究員¹⁾**Key words :** ES細胞, ジーンターゲティング, in vitro differentiation

はじめに

近年, embryonic stem (ES)細胞を用いた変異マウスの解析法は, 急速に拡大してきており, 新しい遺伝子が同定されると同時に, そのノックアウト(KO)マウスの作成が行われる時代となってきた. このマウスを作成するまでの時間, 労力, そして費用は甚大であり, どの研究室でも出来るといった研究ではないのも事実である. しかしKOマウスの細胞を用いた実験は, 細胞生物学において極めて有力な情報を提供してくれることは疑いようがない. 時間, 労力, そして費用を節約するために, さらにある遺伝子が発生段階において必須である場合には, その遺伝子のKOマウスは少なくとも成体では得られないことになるので, その打開策の一つとして, ダブルKO ES細胞を作成することがある. ホモ変異の効果をES細胞レベル, あるいはin vitro differentiationにより血液, 神経, 筋肉などの細胞に分化させて検討することが可能となる.

正常細胞は2倍体である. 両方のアレルに変異を入れることは, 通常, 相同組み換えにより一方のアレルを変異させたES細胞よりキメラマウスを経て, ヘテロ変異マウス(F1)を得, その交配による子孫マウス(F2)で達成される. この行程を経ずに, ヘテロ変異ES細胞を高濃度のG418存在下で細胞を培養す

ることにより, ホモ変異ES細胞を作成することができる¹⁾. 高い濃度のG418に抵抗性となるためには細胞はneo耐性遺伝子数を増やさねばならず, 相同染色体間での組み換えによって, 偶然に両方のアレルにneo耐性遺伝子を有するようになった細胞のみが生き残ることを期待する方法である. 他のダブルKO ES細胞作成方法として, neo耐性遺伝子以外の, 例えば目的とする遺伝子をhygromycin耐性遺伝子で置換したtargeting vectorを既にneo耐性となったヘテロ変異ES細胞に導入する方法がある. あるいはCre-loxPシステムを用いて, neo耐性遺伝子の両端にloxPサイトを持ったtargeting vectorを野生型ES細胞に導入し, Cre発現ベクターを発現させて, neo耐性遺伝子を除き, その後再び同じtargeting vectorを導入するという方法がある. 高濃度G418による方法が最も簡単であり, 一般的に行われているので, 以下にこの方法を紹介する.

またES細胞は, その一個はマウス一匹と当価とすることもでき, 培養条件を変更することにより, 様々な細胞に分化させることが可能である²⁾. 我々は, ES細胞を肥満細胞, マクロファージや心筋細胞にin vitroで分化させ, ホモ変異の解析を行ってきた. このES細胞のin vitro differentiation法も紹介する.

ダブルKO ES細胞の作成法

通常, ES細胞はフィーダー細胞(マウス胎児線

平成13年1月10日受理

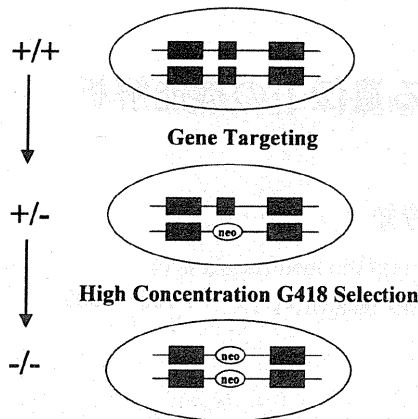


図1 ダブルノックアウトES細胞の作成

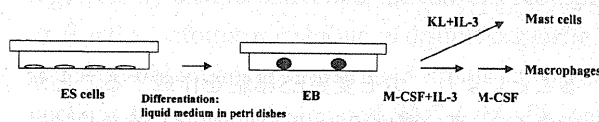


図2 ES細胞の in vitro differentiation法

維芽細胞) 上で培養される。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)+15% fetal calf serum+1% LIF conditioned medium+ 1.5×10^{-4} M monothioglycerolを培地として用いる。正常細胞の混入を避けるため、常法によってヘテロ変異ES細胞を作成後、フィーダー細胞非依存性となるようにゲラチンでコートされたディッシュ上で培養する。

フィーダー細胞非依存的に増殖するヘテロ変異ES細胞を、様々な高濃度のG418存在下で培養を開始する。通常、1 mg/mlの濃度から開始する。この際、高濃度G418は極めて酸性であるため、pH 7.4前後に中和することが大切である。7から10日間、細胞を培養し、単一コロニーをピックアップし、その後、サザン法によって、ホモ変異の有無を確認する。ちなみにMEK kinase 1 (MEKK1)やMEKK2のダブルKO ES細胞は、10mg/ml G418存在下から選出された^{3,4,7)}。このG418の濃度はneo耐性遺伝子のプロモーターやターゲティングする遺伝子などに依存する。

ES細胞の in vitro differentiation

この方法により、ある遺伝子のKOマウスが胎生致死であった場合でもダブルKO ES細胞を様々な細

胞に分化させることによって、その遺伝子の機能解析を分化した細胞あるいはその過程でのレベルで行うことが可能となる。

まずES細胞からembryoid body (EB) に分化させる。健康なEBを作成することは重要なポイントである。leukemia inhibitory factor (LIF)非存在下で細胞が培養ディッシュに接着させないようにするため、メチルセルロース培地あるいはペトリディッシュ上の液体培地で培養する。事前に各社のペトリディッシュの検討が必要となる。液体培地の場合、短期間(2-9日間)でEBが作成でき、その回収が容易であることから我々はこの方法を用いた。

肥満細胞への分化誘導

LIF非存在下で培養し6日目にEBを回収した後、トリプシン処理により、単一細胞にし、この細胞をc-kit ligand (KL)とIL-3を含有した培地で培養を開始する。非接着細胞をこの培地下で継代していくことにより、2-4週間後より肥満細胞として実験を行える⁷⁾。

マクロファージへの分化誘導

肥満細胞と同様にEBを処理した後、M-CSFとIL-3含有培地で2日間培養後、非接着細胞を新しくM-CSFのみ含有した培地にて培養を開始する。マクロファージはその後、接着細胞として増殖する。2週間後よりマクロファージとして実験に供する。いずれの系においても、特異的細胞表面マーカーにより、その分化を確認した上で実験を開始する⁶⁾。

心筋細胞の分化に関しては、比較的複雑なため、成書あるいは我々の論文を参照されたい^{5,8)}。

おわりに

ES細胞を用いた相同組み換えによるジーンターゲティング法は、発生学、免疫学、生化学など様々な分野で、有力な実験手段となっている。そしてES細胞に関する知識が日進月歩で深くなっていく今日、ES細胞から様々な臓器を作成することが決して不可能でなくなりつつある。倫理的問題はあるにせよ、ES細胞を用いた分化増殖や細胞死などの現象の解析は今後も重要な位置を占めると思われる。

ES細胞を用いた実験は主に、筆者が米国コロラド州デンバーNational Jewish Medical and Research CenterのGary L. Johnson博士の研究室において行った。また、ES細胞のin vitro differentiationに関わる研究はGordon M. Keller博士とNaohiro Terada博士との共同研究によるものである。

stem cells. *Cells a laboratory manual* 1998 ; 8.1-8.22, Cold Spring Harbor Press, New York.

引用文献

- 1) Mortensen RM, Conner DA, Chao S, Geisterfer AT, Seidman JG. Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2391-2395
- 2) Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 862-869
- 3) Yujiri T, Sather S, Fanger GR, Johnson GL. Role of MEKK1 in cell survival and activation of JNK and ERK pathways defined by targeted gene disruption. *Science* 1998; **282**:1911-1914.
- 4) Yujiri T, Fanger GR, Garrington TP, Schlesinger TK, Gibson S, Johnson GL. MEK kinase 1 transduces JNK activation in response to changes in microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem* 1999; **274**:12605-12610.
- 5) Minamino T, Yujiri T, Papst PJ, Chan ED, Johnson GL, Terada N. MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:15127-15132.
- 6) Yujiri T, Ware M, Oyer R, Russell D, Zaitso Y, Clarke P, Tyler K, Oka Y, Henson P, Johnson GL. Cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase but not NFkB are regulated by MEK Kinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**, 7272-7277.
- 7) Garrington T, Ishizuka T, Papst PJ, Chayama K, Webb S, Yujiri T, Sun W, Sather S, Russell DM, Gibson SB, Keller G, Gelfand EW, Johnson GL. MEKK2 gene disruption causes loss of cytokine production in response to IgE and c-Kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells. *EMBO J* 2000; **19**: 5387-5395
- 8) Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. Culture and in vitro differentiation of mouse embryonic